

Thesis

WURZBURG

1967

Aus dem Institut für Physiologische - Chemie
der Universität Würzburg
Komm. Vorstand: Professor Dr. F. Bramstedt

VERÄNDERUNGEN VERSCHIEDENER
RNS - QUALITÄTEN AUS RATTENLEBERN
UNTER EINWIRKUNG DES CARCINOGENS
N - NITROSOMORPHOLIN

INAUGURAL - DISSERTATION

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Ulrich/Dege
aus Jena

Würzburg 1967

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR ROAD
PALO ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153518_0125

Aus dem Institut für Physiologische - Chemie
der Universität Würzburg
Komm. Vorstand: Professor Dr. F. Bramstedt

VERÄNDERUNGEN VERSCHIEDENER
RNS - QUALITÄTEN AUS RATTENLEBERN
UNTER EINWIRKUNG DES CARCINOGENS
N - NITROSOMORPHOLIN

INAUGURAL - DISSERTATION

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Ulrich Dege
aus Jena

Würzburg 1967

Referent: Privatdozent Dr. Dr. H. Fasold

Koreferent: Professor Dr. F. Bramstedt

Tag der Promotion: 10. 11. 67

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Experimentelles	
1. Herstellung von N - Nitrosomorpholin	2
2. Versuchstiergruppen	2
3. Inkubation mit ^{14}C - Orotsäure	3
4. Leberaufarbeitung	3
5. Extraktion der RNS	4
6. Sephadex - Filtration	5
7. Charakterisierung der RNS - Fraktionen	
A. Quantitative Bestimmung	5
B. Qualitative Untersuchungen	6
Gradienten - Zentrifugation, Einbaugeschwindigkeiten der RNS - Fraktionen, Basenanalysen, Basenanalysen mit ^{32}P - Markierung	
III. Ergebnisse	
1. Histopathologische Untersuchungen	11
2. Makroskopische Befunde	12
3. Quantitative RNS - Vergleiche	13
4. Basenanalysen	13
5. Sedimentationsverhalten	14
6. ^{14}C - Orotsäure - Einbau	15
IV. Diskussion	19
V. Zusammenfassung	21
VI. Literaturverzeichnis	23

I.

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Von den als Carcinogen erkannten Nitrosaminen (1) verdient das N-Nitrosomorpholin (NNM) (2) besondere Beachtung, da es mit hoher Sicherheit und ungewöhnlich rasch Tumoren bei Versuchstieren entstehen läßt.

Verwendet man als Versuchstiere Ratten oder Mäuse, so induziert das NNM hepatozelluläre Carcinome. Die hierbei schon relativ früh lichtmikroskopisch erfaßbaren Veränderungen sind am Pathologischen Institut der Universität Würzburg (P.BANNASCH und H.A.MÜLLER) (3) eingehend untersucht und beschrieben worden. Es ist hervorzuheben, daß morphologisch das praecanceröse Geschehen klar vom cytologischen Bild nach dem "Umschlag ins Carcinom" differenzierbar ist: Während zunächst eine Glycogenvermehrung, einhergehend mit relativer Abnahme der cytoplasmatischen Basophilie, sowie eine ausgeprägte Hypertrophie des glatten endoplasmatischen Reticulums charakteristisch sind, ist der "Umschlag ins Carcinom" gekennzeichnet durch ein entgegengesetztes Zellverhalten, nämlich Abnahme des Glycogens bei gleichzeitiger Vermehrung der cytoplasmatischen Basophilie. Im praecancerösen Stadium beobachtete Kernveränderungen in Form von Volumenvergrößerung und Mitoseanomalien werden als bedeutungslos für die Tumorgenese angesehen (3).

Ausgehend von diesen Erkenntnissen war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, das Verhalten verschiedener Ribonucleinsäure-Fraktionnen während der Phase der lichtmikroskopisch beobachteten praecancerösen Veränderungen zu untersuchen.

II.

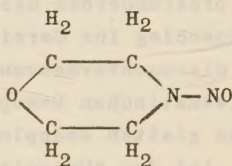
EXPERIMENTELLES

1. Herstellung von N-Nitrosomorpholin (NNM)

Das NNM wurde im wesentlichen nach der von L. KNORR (4) angegebenen Methode dargestellt: Im Wasser 1:1 (Vol.:Vol.) gelöstes Morpholin (130ml) wurde mit 50%iger Schwefelsäure (110ml) versetzt. In diese stark saure Lösung wurde bei guter Kühlung (5°C) und unter ständigem Rühren in Wasser gelöstes Natriumnitrit (440g NaNO₂ in 600ml H₂O gelöst) eingetragen. Das NNM, das sich als gelbe Ölschicht über der Salzlösung absetzte, wurde in Äther gesammelt, durch Schütteln mit Kalilauge vollständig von salpetriger Säure befreit und über Natriumsulfat getrocknet. In dem Rotationsverdampfer wurde dieses Äther - Nitrosomorpholin - Gemisch eingedampft. Das so gewonnene NNM wurde im Anschluß daran durch Vakuumdestillation gereinigt. Destilliert wurde bei einem Unterdruck von 16mmHg bei 107,5°C. Das Destillat wurde als Vor-, Zwischen-, Haupt- und Schlußfraktion jeweils gesondert gesammelt. Für die Tierversuche wurde nur die Hauptfraktion verwandt, die übrigen Fraktionen wurden verworfen. Die Ausbeute lag bei 68% der Theorie.

NNM: Siedepunkt bei 223-224,5°C bei 747mmHg
Schmelzpunkt der Kristalle bei 29°C

Formel



2. Versuchstiergruppen

Die bei Versuchsbeginn etwa 200g schweren Inzuchtratten (Sprague-Dawley, Männchen) wurden in Zweiergruppen aufgeteilt. Sie bekamen während 60 bis 72 Tagen eine 12mg%ige NNM-Lösung als Trinkwasser ad libitum angeboten. Nach dieser Zeit hatten sie eine durchschnittliche Menge von 190mg NNM pro Tier aufgenommen. Die Kontrolltiere wurden mit Leitungswasser getränkt. Versuchs- wie Kontrolltiere wurden mit Altromin R gefüttert.

3. Inkubation mit ^{14}C - Orotsäure

Um Aussagen über den Einbau und die Umsatzraten der verschiedenen RNS - Fraktionen zu erhalten, wurde den Tieren vor der Leberexstirpation $6\text{-}^{14}\text{C}$ - Orotsäure (Amersham, England, spezifische Aktivität 30mC/mMol) gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, in Äthernarkose intraperitoneal injiziert ($10\text{mC}/100\text{g}$ Körpergewicht, entsprechend $0,5\text{ml}$ Lösung). Die Inkubationszeit betrug bei den einzelnen Aufarbeitungen 10, 30, 50, 70, 90, 120 und 150 Minuten.

4. Leberaufarbeitung

Jeweils zwei NNM - Tieren und zwei Kontrolltieren (K), die zuvor fünfzehn Stunden gefastet hatten, wurden die Lebern in Äthernarkose exstirpiert. Für die histologische Beurteilung wurde jeweils aus dem linken oberen Leber-Lappen ein ca. 20mm langer und 3mm breiter Streifen herausgeschnitten und in Carnoy'scher Lösung (6 Teile absoluter Alkohol, 3 Teile Chloroform, 1 Teil Eisessig) fixiert. Unmittelbar nach der Exstirpation wurden die Lebern in eisgekühlter $0,25\text{M}$ Saccharose - Lösung, die $0,05\text{M}$ Tris - Puffer ($\text{pH } 7,6$) und $0,003\text{M}$ CaCl_2 enthielt (5), homogenisiert (Potter - Elvehjem - Homogenisator). Das Homogenat wurde anschließend während 30 min bei 0°C in der Spinco - Ultrazentrifuge (UZ, Typ L 50) im Rotor 30 bei 21000 Upm (ca. 40000 g) zentrifugiert. Der Überstand (Ü I) enthielt die Cytoplasmafraktion mit den Ribosomen, der Niederschlag (Nd I) die Zellaggregate, Zellen, Kerne und Mitochondrien.

a) Kerndarstellung: Aus dem Niederschlag wurden nach der von CHAVEAU und Mitarbeitern angegebenen Methode (6) die Kerne dargestellt. Hierfür wurde Nd I in $2,4\text{M}$ Saccharose - Lösung, die $0,003\text{M}$ CaCl_2 enthielt, aufgenommen und kurz homogenisiert. Das Homogenat wurde auf mehrere Zentrifugenröhrchen (34ml) so verteilt, daß diese zur Hälfte mit Homogenat, zur anderen Hälfte mit frischer $2,4\text{M}$ Saccharose - Lösung gefüllt waren. Durch Schütteln wurden beide Anteile miteinander vermischt und anschließend während 60 min bei 0°C bei 30000 Upm (ca. 100000 g) zentrifugiert (Rotor 30, L 50) = Zentrifugation II. Der Überstand (Ü II) wurde verworfen, der Niederschlag, der ausschließlich aus Kernen besteht, wurde in $0,14\text{M}$ NaCl gewaschen und in 10ml $0,14\text{M}$ NaCl suspendiert. In dieser Kernsuspension waren lichtmikroskopisch keine cytoplasmatischen Verunreinigungen zu erkennen. Gegenüber morpho-

logisch homogenen Kernsuspensionen bei den Kontrolltieren konnte man bei den Kernen der NNM - Tiere eine Vielzahl mit erheblicher Volumenvergrößerung beobachten. Die Kerne wurden in der Bürker'schen Zählkammer ausgezählt.

b) Ribosomendarstellung: Die Cytoplasma - Fraktion (Ü I) wurde zusammen mit der Kern - Fraktion bei Zentrifugation II gefahren. Das Sediment (Nd II) bestand aus "schweren Ribosomen" (≥ 80 Svedberg - Einheiten = S). Der Überstand (Ü II) enthielt die "leichten Ribosomen" (≤ 80 S) und die lösliche RNS des Cytoplasmas. Durch eine dritte Zentrifugation (0°C , Rotor 50, L 50) während 60 min bei 50000 Upm (ca. 150000 g) wurden hieraus schließlich auch noch die "leichten Ribosomen" sedimentiert (Nd III).

Um einen fermentativen Abbau des Untersuchungsmaterials möglichst klein zu halten, wurden sämtliche bis hierher beschriebenen Arbeitsgänge bei 2° - 4°C ausgeführt.

5. Extraktion der Ribonucleinsäuren

a) Kern - RNS: Durch Phenolextraktion (7,8,9) und Temperaturfraktionierung (10) wurden aus den Kernen zwei RNS - Qualitäten gewonnen - die 50° -RNS, die wahrscheinlich zum größten Teil den Nukleoli entstammt, und die 65° -RNS, die im wesentlichen der m - RNS (Matrizen - RNS, messenger - RNA) entspricht.

Die in 10ml 0,14M NaCl suspendierten Kerne wurden mit dem gleichen Volumen flüssigen Phenols (90% Phenol, 10% 0,14M NaCl, mit 1n NaOH auf pH 6 eingestellt) versetzt. Dieses Gemisch wurde dann unter ständigem Schütteln 15 min lang bei 50°C gehalten und anschließend in einer Kältemischung schnell auf 4°C abgekühlt. In der Kälte wurde sodann die wässrige Oberphase von der phenolischen Phase durch Zentrifugation getrennt (Servall - Zentrifuge, Modell SS-1, 15 min bei ca. 20000g). Diese Phasentrennung wurde bei den folgenden RNS - Extraktionen stets in der gleichen Weise durchgeführt.

Die nach Abpipettieren der Oberphase verbleibende Unter- und Zwischenphase wurde in der Kälte mit gleichem Volumen 0,14M NaCl gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Oberphase wurde verworfen, Unter- und Zwischenphase nochmals mit dem gleichen Volumen 0,14M NaCl versetzt, während 15 min bei 65°C im Wasserbad unter ständigem Schütteln erhitzt und danach rasch auf 4°C abgekühlt. Durch die sich anschließende Phasentrennung erhielt man in der Oberphase nun die 65° -RNS.

b) Ribosomale RNS: Die schweren wie die leichten Ribosomen wurden in je 10ml Puffer (0,05M Tris - HCl, 0,025M KCl, 0,005M $MgCl_2$, pH 7,6) (11), der 0,1% Natriumdodecylsulfat enthielt, aufgenommen, mit 10ml Phenol (s.o.) versetzt und vor der Phasentrennung eine Stunde bei 4°C geschüttelt.

6. Sephadex - Filtration (12)

Die gewonnenen Oberphasen wurden über Sephadex G 75 (Pharmacia Uppsala, Schweden) - Chromatographiesäulen (20.3 cm) in 0,01M Phosphatpuffer, pH 7,2 (13), der $1 \cdot 10^{-4}M$ $MgCl_2$ (14) enthielt, gereinigt. Hierbei gelang es, die jeweiligen RNS - Fraktionen von dem in der wässrigen Oberphase gelösten Phenol und weiteren niedermolekularen Bestandteilen, wie nicht inkorporierter Orotsäure und RNS - Bruchstücken, sowie insbesondere der RNase, abzutrennen.

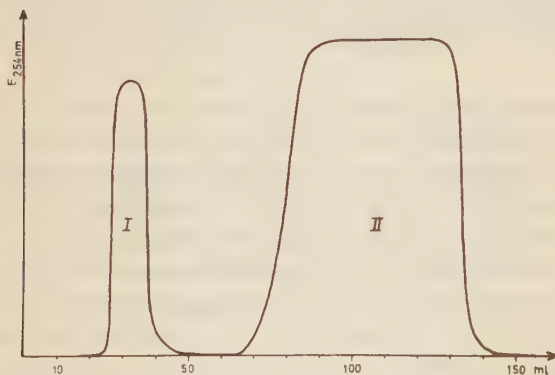


Abb. 1. Sephadex G 75 - Filtration (Säule 20.3cm) von 5ml Oberphase einer bei 50°C extrahierten Kern - RNS; I: RNS, II: Phenol, Fließgeschwindigkeit: 0,7ml/min

Die Filtrationen wurden in der Kälte bei 4°C ausgeführt. Von den Eluatn wurde in einem Spektralphotometer (Uvicord der Firma LKB, Stockholm) bei 255 - 265nm die Extinktion automatisch registriert und gedruckt. Der die RNS enthaltende Anteil der Säuleneluat wurde in eisgekühlten Gefäßen aufgefangen.

7. Charakterisierung der RNS - Fraktionen

A. Quantitative Bestimmung: Durch Messung der Extinktion der

Säuleneluat (bei pH 7,2, im Zeiss - Spektralphotometer PMQ II) bei 260nm (E_{260}) und 1 cm Schichtdicke (Quarzküvette) kann durch die Beziehung

$$c = \frac{E_{260}}{\epsilon_m} \left[\frac{\text{mMol}}{\text{ml}} \right]$$

die Konzentration der Eluate bestimmt werden. ϵ_m stellt den molaren Extinktionskoeffizienten dar, der für ein Nukleotidgemisch bei pH 7,2 mit $12,3 \cdot 10^3$ angenommen wurde.

Die für das jeweilige Kern - RNS - Eluat gemessene Anzahl an optischen Dichteeinheiten (OD_{260}) konnte auf die definierte Kernzahl bezogen und somit die OD_{260} pro Einzelkern berechnet werden.

B. Qualitative Untersuchungen

a) Gradienten - Zentrifugation: Läßt man RNS in einem Saccharose - Gradienten, dessen Konzentration von der Oberfläche bis zum Boden linear zunimmt, sedimentieren, so ergibt sich eine Auftrennung entsprechend der Masse, so daß die RNS - Qualitäten durch die erhaltenen Sedimentationskonstanten (S) charakterisiert werden können (15).

Die linearen Saccharose - Gradienten wurden mit einer Mischbatterie hergestellt, die gleichzeitig drei Zentrifugenbecher (30ml) füllte (16). Die Ausgangslösungen für die Gradienten enthielten 5% und 20% Saccharose in einem 0,01M Natriumacetat - 0,1M NaCl - Puffer, pH 5,1, der mit $1 \cdot 10^{-4}$ M $MgCl_2$ versetzt war (14). Die Gradienten wurden mit den über Sephadex gereinigten RNS - Fraktionen überschichtet (1-2ml), wobei die Gesamtmenge zwischen 1 und 5 Einheiten OD_{260} lag. Die überschichteten Gradienten wurden in der UZ (L 50) im Schwingbecherrotor Sw 25/1 bei 0°C und 23000 Upm (ca. 52000 g) während 15 Stunden zentrifugiert. Im Anschluß daran wurde der Inhalt des Zentrifugenbechers, nachdem zuvor dessen Boden mit einer Injektionskanüle (Nr. 12) punktiert worden war, über eine Schlauchpumpe abgesogen; gleichzeitig wurde mit dem Spektralphotometer (Uvicord, LKB) bei 254nm die Extinktion gemessen und gedruckt und die Lösung direkt in Zählgläsern für die Flüssigkeits - Szintillationsmessung aufgefangen. Sie wurden wie folgt weiterverarbeitet (12): Nach Eintrocknen unter Erwärmen bis 50°C wurde der Bodensatz, der hauptsächlich aus Rohrzucker bestand, in 1ml Dimethylformamid bei Erwärmung auf 60°C während einer Stunde gelöst, die RNS anschließend durch Zusatz von 1ml Hyamin - Lösung

(Firma Packard) während 12 bis 15 Stunden bei 37°C hydrolisiert und schließlich nach Zugabe von je 12ml Toluol - Szintillator (5g 2,5-Diphenyloxazol und 0,1g 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol der Firma Packard, gelöst in 1000ml Toluol) im Tricarb (Firma Packard Instruments) ausgezählt. Die Zählausbeute lag bei ca. 80%. Sowohl Dimethylformamid wie Rohrzucker verursachten keine Löscheffekte.

b) Einbaugeschwindigkeiten der RNS - Fraktionen: Um einen annähernden Vergleich der spezifischen Aktivitäten zu ermöglichen, wurden die von den mit 1 bis 5 Einheiten OD₂₆₀ überschichteten Gradienten gemessenen Impulszahlen sämtlich auf eine Auftragsmenge von 2 Einheiten OD₂₆₀ umgerechnet.

c) Basenanalysen: Durch alkalische Hydrolyse wurden die Ribonukleinsäuren in Nukleotide aufgespalten. Sie lassen sich mit Hilfe der Ionenaustauscher - Chromatographie als Monophosphatverbindungen, Adenosin (AMP)-, Guanosin (GMP)-, Cytidin (CMP)- und Uridinmonophosphat (UMP), darstellen und quantitativ bestimmen, so daß man für die verschiedenen RNS - Fraktionen das Basenverhältnis $\frac{CMP + GMP}{AMP + UMP}$ errechnen kann (17,18).

Die gereinigten RNS - Fraktionen wurden gesammelt und gefriertrocknet. Die Trockensubstanz wurde mit 0,3n KOH während 18 Stunden bei 37°C hydrolisiert und anschließend mit 3n HClO₄ neutralisiert (Indikatorpapier). Der sich bildende Niederschlag von KClO₄ wurde in der Christ - Tischzentrifuge (Kälteraum) bei ca. 10000 g während 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde chromatographiert.

1) Chromatographie an Dowex 1x8, 200-400mesh (19): Als Eluens wird für diesen Ionenaustauscher Ameisensäure verwandt, deren für die Elution des jeweiligen Nukleotids optimale Molarität in verschiedenen Versuchsreihen ermittelt wurde (Abb. 2). Für spätere Versuche mit ³²P - markierten Nukleotiden, deren Aktivitäten in der Durchflußzelle (Tricarb) bestimmt werden sollten, erwies sich dieses Verfahren jedoch wegen der hohen Ameisensäure - Konzentrationen als unbrauchbar. Deshalb wurde dem nachstehend beschriebenen Ionenaustauscher - System der Vorzug gegeben.

2) Chromatographie an Dowex 1x2, 200-400mesh (20): Hierfür reichten wesentlich geringere Konzentrationen an HCOOH aus, um gleich-

wertige Ergebnisse zu erhalten. Es wurden nacheinander die Nukleotide CMP, AMP, UMP und GMP mit den in Abb. 3 in entsprechender Reihenfolge angeführten Lösungsmitteln dargestellt. Bei CMP, AMP und GMP war eine beginnende Auftrennung in die 3'- und 5'- Nukleotide zu beobachten, wobei die in Abb. 3 jeweils links dargestellten Gipfel dieser Nukleotide immer von 3'- Monophosphat gebildet werden.

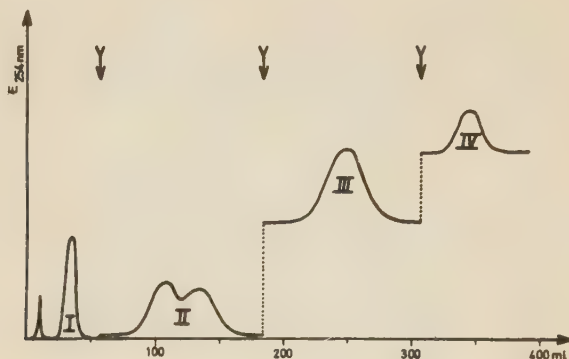


Abb. 2. Chromatographie von hydrolisierter ribosomaler RNS der schweren Ribosomen ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ Mol/ml; Auftrag: 1,5 ml) an Dowex 1x8, 200-400 mesh; Säule: 0,8 · 14,5 cm; Fließgeschwindigkeit: 0,55 ml/min; Y: Lösungsmittelwechsel von 0,23 M HCOOH auf 0,5 M HCOOH, auf 3 M HCOOH und auf 6 M HCOOH; I: CMP, II: AMP 3'5', III: GMP, IV: UMP

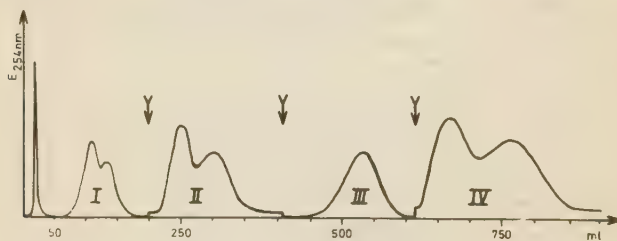


Abb. 3. Elutionsdiagramm bei Chromatographie von hydrolisierter ribosomaler RNS der schweren Ribosomen ($c = 1 \cdot 10^{-2}$ Mol/ml; Auftrag: 1,5 ml) an Dowex 1x2, 200-400 mesh; Säule: 0,8 · 10 cm; Fließgeschwindigkeit: 1,5 ml/min; Y: Lösungsmittelwechsel von 0,02 M HCOOH auf 0,15 M HCOOH, auf 0,05 M Ammonium - Formiat — 0,01 M HCOOH und auf 0,1 M Ammonium - Formiat — 0,1 M HCOOH (v.l.i.n.re. gelesen); I: CMP 3'5', II: AMP 3'5', III: UMP, IV: GMP 3'5'

Die ursprünglich im Dowex als Gegenion enthaltenen Cl^- - Ionen mußten, um das Kunstharz für die zu verwendenden Lösungsmittel zu präparieren, ausgewaschen werden. Der Ionenaustauscher mußte in die Formiat - Form überführt werden. Dies geschah durch Waschen mit 6M HCOOH , bis sich in der Waschflüssigkeit mit Silbernitrat keine Cl^- - Ionen mehr nachweisen ließen. Im Anschluß daran wurde das Säulenmaterial mit aqua bidestillata neutralisiert, danach kurz mit dem ersten Eluens, 0,02M HCOOH , durchgewaschen und dann in die Säulen (0,8-10cm) gefüllt.

Bei jedem Trennungsgang wurden folgende Lösungsmittel verwandt: 0,02M HCOOH für CMP, 0,15M HCOOH für AMP, 0,05M Ammonium - Formiat — 0,01M HCOOH für UMP und 0,1M Ammonium - Formiat — 0,1M HCOOH für GMP. Das Säuleneluat wurde durch ein Spektralphotometer (Uvicord, LKB) geleitet, das die Extinktion bei 254nm registrierte, und anschließend fraktioniert (Beckman Fraktionssammler, Mod. 132). Um die Säulenfließgeschwindigkeit, 1,5ml/min, konstant zu halten, wurde zwischen Uvicord und Fraktionssammler eine Schlauchpumpe eingeschaltet.

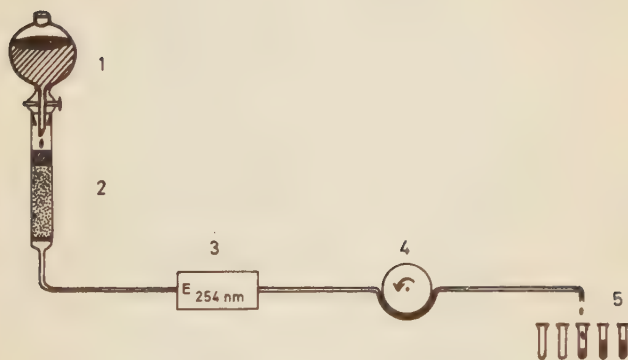


Abb. 4. Versuchsanordnung für die Basenanalysen:
1: Gefäß mit Lösungsmittel, 2: Säule, 3: Spektral-
photometer, 4: Schlauchpumpe, 5: Fraktionssammler

Die aufgefängenen Fraktionen wurden bei den jeweiligen Wellenlängen maximaler Absorption ($\lambda_{\max}$) im Spektralphotometer (Zeiss, PMQ II) ausgemessen, um jedes Nukleotid unter Bezug auf den molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ_{mol}) quantifizieren zu können. Nach Vereinigung aller Fraktionen eines Nukleotids wurde von dieser Lösung das Volumen bestimmt und die Extinktion ($E_{\max}$) bei $\lambda_{\max}$ gemessen. Durch die Beziehung

$$c = \frac{E_{\max}}{\epsilon_{\text{mol}}} \cdot \text{ml} \left[\text{mMol} \right]$$

wurde der mengenmäßige Anteil der einzelnen Basen bestimmt. Die Summe aller vier Nukleotide wurde = 100% gesetzt und daraus der prozentuale Anteil einer jeden Base berechnet. Für die molaren Extinktionskoeffizienten gelten bei einem pH von 2 die in Tab. 1 angegebenen Werte.

Von jeder RNS - Fraktion wurden drei Basenanalysen ausgeführt und die Mittelwerte bestimmt.

Tab. 1: Wellenlänge des Absorptionsmaximums ($\lambda_{\max}(\text{nm})$) und molarer Extinktionskoeffizient (ϵ_{mol}) der Nukleotide AMP, CMP, GMP und UMP bei pH 2.

	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	ϵ_{mol}
CMP	278-280	$12,3 \cdot 10^3$
AMP	258-259	$14,9 \cdot 10^3$
UMP	260	$9,6 \cdot 10^3$
GMP	256-257	$12,2 \cdot 10^3$

Tab. 2: Auswertung einer Basenanalyse.

Elutionsmittel	Nukleotid	ml Eluat	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	$E_{\max}$	$c(\text{mMol})$	%
0,02M HCOOH	CMP	85	278	0,213	1,415	24,05
0,15M HCOOH	AMP	125	259	0,106	0,890	15,10
0,05M Am.-Form. 0,01M HCOOH	UMP	135	260	0,085	1,195	20,35
0,1 M Am.-Form. 0,1 M HCOOH	GMP	277	256	0,105	2,382	40,50
					100% =	5,882

$$\frac{\text{CMP} + \text{GMP}}{\text{AMP} + \text{UMP}} = \frac{24,05 + 40,50}{15,10 + 20,35} = 1,82$$

d) Basenanalysen mit ^{32}P - Markierung: Ausgehend von der Überlegung, daß im Verlauf der Carcinogenese außer den vier Hauptbasen Adenin, Cytosin, Guanin und Uracil womöglich auch seltene Basen in veränderten Anteilen in die RNS eingebaut werden könnten, und zwar in so geringem Maße, daß sie mit der optischen Aufzeichnung im Spektralphotometer nicht erkannt werden können, wurden bei einer Leberaufarbeitung zwei NNM - Tiere und zwei K - Tiere 30 min mit ^{32}P (als Na-Orthophosphat in 2ml physiologischer NaCl gelöst) inkubiert. Jedes Tier bekam 2,5 mC i.p. injiziert.

Nach der wie üblich durchgeführten RNS - Extraktion und Hydrolyse wurde nach der Nukleotid - Chromatographie das Eluat zunächst durch das Spektralphotometer geleitet, von dort durch eine eigens angefertigte Durchflußzelle (Abmessungen: 14.8.1mm), die mit einer feinen Glimmerfolie (ca. $3\text{mg}/\text{cm}^2$) abgedeckt war. Unmittelbar über der Durchflußzelle befand sich ein β -Endfenster - Zählrohr, das an ein Zählgerät (Frieeseke & Hoepfner) und an dieses wiederum ein Linienschreiber (Philips) angeschlossen war. Mit dem Schreiber wurden die Impulse aufgezeichnet. Das Eluat wurde nach Passage der Durchflußzelle zu 10ml - Fraktionen in Zählgläschen aufgefangen, die für die Auszählung im Tricarb - Szintillationszähler präpariert wurden (s.o.).

Sowohl bei der graphischen Darstellung wie bei der Szintillationsauszählung konnten jedoch seltene Nukleotide nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden; wohl aber ließen sich die Ergebnisse der kalten Basenanalysen auf diesem Wege bestätigen.

III.

ERGEBNISSE

1. Histopathologische Untersuchungen

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der vor jeder Aufarbeitung entnommenen, in Canoy'scher Lösung fixierten Leber - Proben werden für die NNM - geschädigten Lebern bestimmte, für die prae-canceröse Phase typische Veränderungen an den Kern- und Cytoplasmastrukturen beobachtet. Die Zellkerne und Nukleoli sind meist deutlich vergrößert, Mitosen und insbesondere Mitosestörungen treten sehr zahlreich auf. Im Cytoplasma erkennt man die für dieses Stadium typische Glycogenspeicherung (3) bei verminderter teils

diffuser, teils scholliger Basophilie, außerdem liegt stets eine Hypertrophie des glatten endoplasmatischen Reticulums vor, vereinzelt findet man auch die sog. glatten Nebenkerne (21). In einigen Lebern konnten bereits Mikrohepatome, kleine großzelligere Herde mit stärker ausgeprägter Basophilie, nachgewiesen werden.

2. Makroskopische Befunde

Bei fortgesetzter NNM - Tränkung trat der Tod bei den hierfür verwendeten fünf Tieren im Durchschnitt nach 188 Tagen ein, entsprechend einer mittleren Dosis von 525 mg NNM pro Tier.

Tab. 3: Tränkungsdauer mit einer 12mg%igen NNM - Lösung und die in diesem Zeitraum aufgenommene Dosis NNM von fünf spontan gestorbenen Ratten.

	1.Ratte	2.Ratte	3.Ratte	4.Ratte	5.Ratte
Tränkungsdauer (Tage)	159	192	194	194	200
mg NNM/Tier	500,2	457,5	537,8	557,1	572,5

Der Sektionsbefund zeigte bei allen Tieren eine stark ausgeprägte Hepatomegalie. Die Lebern waren bis auf vereinzelte etwa linsengroße makroskopisch normal erscheinende Leberbezirke restlos vom Carcinom durchsetzt. In den Lungen waren zahlreiche Metastasen zu erkennen.

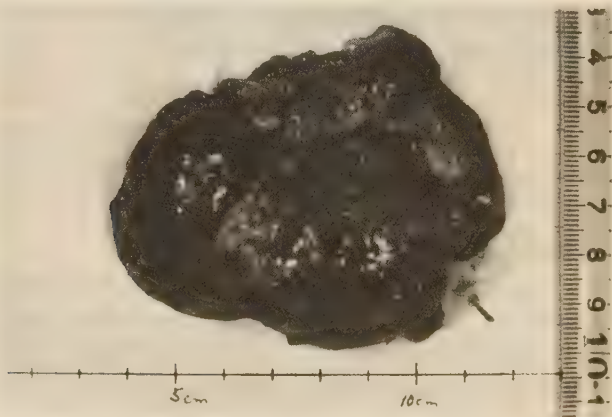


Abb. 5. Leber einer Ratte, die bei Tränkung mit einer 12mg%igen NNM-Lösung nach 194 Tagen spontan verstarb

3. Quantitative RNS - Vergleiche

Die durch Auszählung in der Bürker'schen Zählkammer ermittelte Kernaussbeute wird in Beziehung gesetzt zu der Gesamt - OD₂₆₀ der einzelnen Kern - Fraktionen. Aus dem Gehalt an OD₂₆₀ pro Kern können Rückschlüsse gezogen werden auf die RNS - Konzentration in den Kernen, da die OD₂₆₀ in Relation steht zu der RNS - Konzentration. Die der Tabelle 4 zugrunde gelegten Werte wurden als Durchschnittswerte von vier verschiedenen Aufarbeitungen ermittelt. Vergleicht man nun die sich entsprechenden Werte der Kontroll- und NNM - Fraktionen miteinander, so zeigt sich, daß die OD₂₆₀ - Einheiten und damit der Gehalt an RNS in der NNM - Fraktion stark erhöht sind. Die 50° - RNS der durch NNM alterierten Kerne ist um 35%, die 65° - RNS um 65% vermehrt.

Tab. 4: siehe Text.

RNS-Fraktion	Kerne/g Leber	Ges.-OD ₂₆₀	OD ₂₆₀ /Kern	RNS-Zunahme
K ₅₀	6,0·10 ⁸	33,50	5,58·10 ⁻⁸	
K ₆₅	6,0·10 ⁸	16,21	2,72·10 ⁻⁸	
N ₅₀	5,3·10 ⁸	39,80	7,51·10 ⁻⁸	+ 35%
N ₆₅	5,3·10 ⁸	23,81	4,49·10 ⁻⁸	+ 65%

4. Basenanalysen

Auffallend bei den Resultaten der Basenanalysen sind die zum Teil beträchtlichen Schwankungen des Guanin - Anteils, der bei der aus

Tab. 5: Basenanalysen der 50°- und 65°-Kern - RNS sowie der RNS aus schweren (RS) und leichten Ribosomen (RL) aus normalen (K) und NNM (N) - Rattenlebern.

RNS-Fraktion	CMP %	AMP %	UMP %	GMP %	$\frac{\text{CMP} + \text{GMP}}{\text{AMP} + \text{UMP}}$
K ₅₀	25,73	17,78	25,79	30,70	1,3 ± 0,07
N ₅₀	25,23	16,40	25,37	33,00	1,4 ± 0,06
K ₆₅	26,33	18,90	35,37	19,40	0,85 ± 0,07
N ₆₅	23,65	15,55	29,75	31,05	1,21 ± 0,07
K _{RS}	25,17	15,10	18,16	41,57	2,01 ± 0,07
N _{RS}	27,87	16,10	19,72	36,31	1,79 ± 0,03
K _{RL}	25,14	16,22	20,78	37,86	1,7 ± 0,04
N _{RL}	24,15	15,07	20,73	40,05	1,8 ± 0,05

NNM - Lebern gewonnenen RNS, ausgenommen die Fraktion der schweren Ribosomen, durchweg erhöht ist. Am ausgeprägtesten ist dieser GMP - Anstieg in der 65⁰-Fraktion, in der als einziger Fraktion zusätzlich ein Verlust von Adenin und Uracil zu verzeichnen ist, so daß das Basenverhältnis gegenüber der Kontrolle erheblich verschoben wird. In der RNS der schweren Ribosomen sinkt der Guanin - Anteil und damit das Basenverhältnis merklich ab.

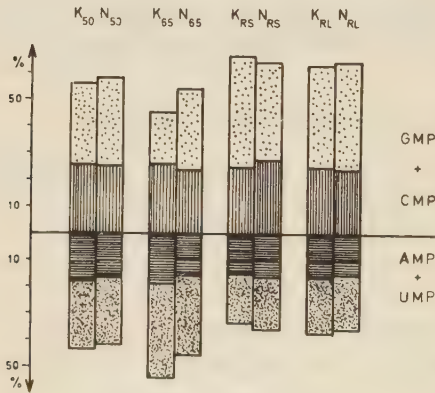


Abb. 6. Prozentuale Basenanteile, dargestellt als Basenverhältnis $\frac{\text{CMP} + \text{GMP}}{\text{AMP} + \text{UMP}}$, der 50⁰- und 65⁰- Kern - RNS sowie der RNS aus schweren (RS) und leichten Ribosomen (RL) von normalen (K) und NNM (N) - geschädigten Rattenlebern

5. Sedimentationsverhalten

Die Gradientenbilder weisen vor allem bei den NNM - Kern - Fraktionen auffallende Unterschiede im Vergleich zu normalen auf. Sowohl in der 50⁰- wie in der 65⁰-Fraktion sind die schweren 28-S-Anteile bei den NNM - Kernen deutlich erhöht, die leichteren 8-S- und 12-S-Qualitäten hingegen treten vermindert auf (s. Abbn. 7 u. 8). Im Sedimentationsverhalten der ribosomalen Fraktionen können keine Unterschiede erkannt werden. Wir finden hier stets die obligaten 28-S- und 18-S-Anteile, wobei in der Fraktion der schweren

Ribosomen der 28-S-Gipfel am ausgeprägtesten ist, während bei den leichten Ribosomen die mit 28 S und 18 S sedimentierenden RNS mengenmäßig ungefähr gleich sind. Beide ribosomalen Fraktionen verfügen nur über einen geringen Anteil von 12-S- bzw. 8-S-RNS (s. Abbn. 9 u. 10).

6. ^{14}C - Orotsäure - Einbau

a) 50⁰-Fraktion: Bei der Kontrollserie verteilen sich die Aktivitätsmaxima nahezu gleichmäßig auf die 8-S- und 12-S-Anteile, in geringem Maße wird auch 18-S-RNS synthetisiert. Bei den NNM - Fraktionen werden dagegen 18-S- und sogar 28-S-Anteile besonders deutlich und schnell markiert, die höchste spezifische Aktivität liegt stets in dem 12-S-Gipfel vor (s. Abb. 7).

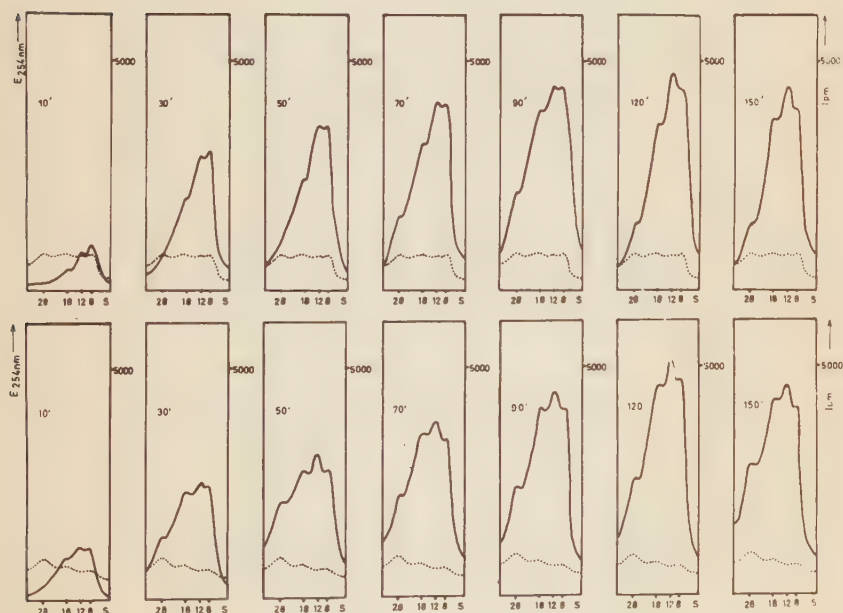


Abb. 7. 50⁰-Kern - RNS: obere Reihe Kontroll-, untere Reihe NNM - Serie

b) 65° -Fraktion: Hier wird von den Kontrolltieren durchweg am stärksten 8-S-RNS gebildet, von den Versuchstieren bevorzugt 12-S-RNS, zusätzlich ist jedoch ein deutlich erhöhter Anteil von 18-S-RNS zu verzeichnen. Insgesamt erscheint die Synthesegeschwindigkeit unter NNM - Vergiftung gegenüber den Kontrollen, beurteilt nach der in die schweren RNS - Anteile nach 30 min inkorporierten Aktivität, beschleunigt. Dagegen durchläuft bei den Kontrollen der Einbau in die Gesamtfraction bereits mit der 30 min - Inkubation das Maximum, während dieses bei NNM - Applikation offenbar erst nach 50 min der Fall ist (s. Abb. 8).

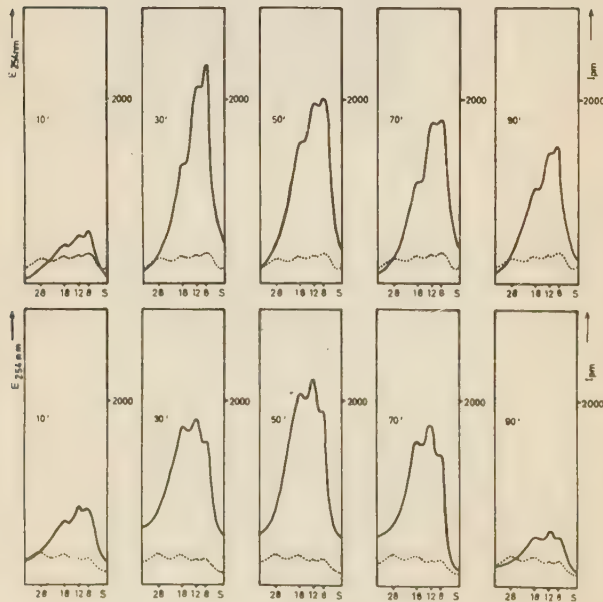


Abb. 8. 65° - Kern - RNS: obere Reihe Kontroll-
untere Reihe NNM - Serie

c) Ribosomale Fraktionen: Bei den schweren Ribosomen (s. Abb. 9) erkennt man bei den Kontrollen nach 30 min einen signifikanten Einbau in die leichte 8-S-RNS, der unter Versuchsbedingungen kaum in Erscheinung tritt. Mit steigender Inkubationszeit nimmt die Synthese der schweren RNS - Anteile in den Kontroll- und NNM - Fraktionen zu. Die Verteilung der Aktivitäten auf die 28-S- und die 18-S-Anteile unterscheidet sich dadurch, daß unter NNM - Einwirkung die 18-S-RNS schneller und stärker, bei den Kontrollen hingegen die 28-S-RNS bevorzugt synthetisiert wird.

Diese Verschiedenheit des Einbaus entspricht im wesentlichen auch den Verhältnissen bei den leichten Ribosomen (s. Abb. 10). Hier findet man auch noch in kleinen Mengen 12-S-RNS, die bei den schweren Ribosomen völlig fehlt.

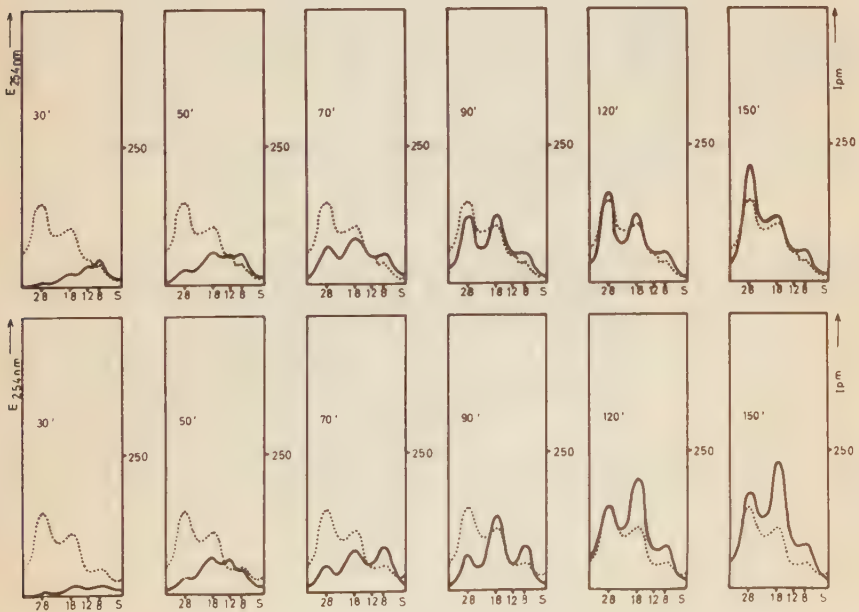


Abb. 9. RNS der schweren Ribosomen; obere Reihe Kontroll-, untere Reihe NNM - Serie

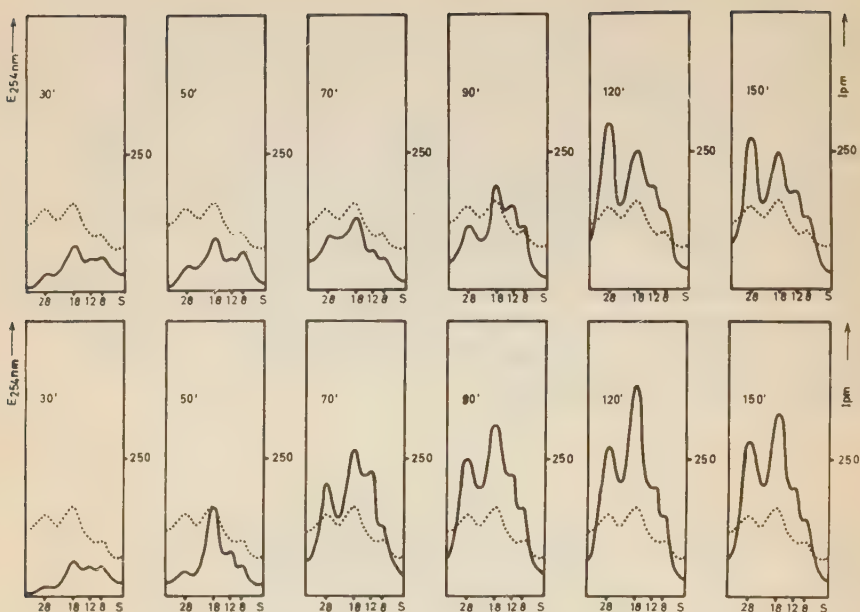


Abb. 10. RNS der leichten Ribosomen; obere Reihe Kontroll-, untere Reihe NNM - Serie

Zu Abbn. 7 bis 10: Sedimentationsverhalten der dargestellten RNS - Fraktionen im Saccharosegradienten (20% - 5%); Auftragsmenge: 2 Einheiten OD₂₆₀;

Ordinaten: : Extinktionen bei 254nm,
— : Impulse pro Minute,

Abszissen: Sedimentationsgeschwindigkeiten in Svedberg - Einheiten (Näherungswerte),

die Inkubationszeiten mit ¹⁴C - Orotsäure sind in die Diagramme eingetragen.

IV.

DISKUSSION

In den Lebern von Ratten, die gleichmäßig über eine Zeitdauer von 60 bis 72 Tagen mit einer 12mg%igen N-Nitrosomorpholin (NNM) - Lösung getränkt werden, entwickeln sich nicht nur morphologisch erkennbare Veränderungen im Sinne einer Praecancerose (3), sondern es werden gleichzeitig qualitative und quantitative Abweichungen vom normalen RNS - Stoffwechsel nachweisbar. Diese Unterschiede entsprechen in vielen Punkten den bereits beschriebenen (12) Alterationen in den RNS von Rattenlebern nach Applikation des schwachen Carcinogens Thioacetamid (TAA).

Auffallend in beiden Kern - RNS - Fraktionen ist zunächst der besonders in der 65⁰-Fraktion signifikant ausgeprägte Guanin - Anstieg, der auch nach TAA - Vergiftung (12,22) eintrat. Diese Änderung in der Basenzusammensetzung bedeutet eine Abwandlung der Primärstruktur dieser RNS - Arten, als deren Folge eine veränderte Funktion denkbar wäre. Die Anreicherung der aus NNM - Kernen gewonnenen 50⁰- und 65⁰- RNS, deren Konzentrationsanstieg in der 65⁰- Fraktion 65% und in der 50⁰- Fraktion 35% gegenüber normalen Kernen ausmacht, könnte als ein Kompensationsversuch für den Mangel an regelhaft gestalteter RNS aufgefaßt werden. Diese Synthesewachstumsrate wird später auch noch im Zusammenhang mit den Veränderungen an der ribosomalen RNS zu betrachten sein.

Vergleicht man die Zusammensetzung der Kern - RNS mit der der ribosomalen RNS, so findet man in beiden aus NNM - Lebern gewonnenen Kern - RNS - Fraktionen die für die Ribosomen charakteristischen Molekülgrößen vor, die mit 28 S und 18 S sedimentieren. Die in den NNM - Kernen erhöht vorliegende RNS entspricht also einer RNS vom ribosomalen Typ.

Für die Anreicherung von RNS im Kernraum und die damit verbundene Kernvergrößerung kann eine Migrationshemmung der RNS vom Kern ins Cytoplasma, wie sie bereits im Verlauf der TAA - Schädigung diskutiert wurde (12,21,23,24,25,26), mitverantwortlich sein.

In der Fraktion der als "schwere" Ribosomen sedimentierenden Polysomen müßte man, da sie zusammen mit der m-RNS (messenger - RNA, Matrizen - RNS) Orte der cytoplasmatischen Proteinsynthese darstellen, schon nach Kurzzeitinkubationen mit ¹⁴C - Orotsäure

radioaktiv markierte m-RNS erwarten können. Diese stellte sich nach Extraktion der "schweren" - Ribosomenfraktion aus Kontroll - Lebern tatsächlich dar, zu erkennen an den deutlich markierten 8-S- und 12-S-Bereichen nach Auftrennung im Saccharosegradienten. In den NNM - Ribosomen ist demgegenüber nur eine geringe Radioaktivität der entsprechenden RNS - Anteile zu verzeichnen, offensichtlich bedingt durch das Fehlen polysomaler m-RNS.

Die Verschiebung des Basenverhältnisses der RNS aus schweren Ribosomen dürfte letztlich einer Abwandlung der Ribosomenstruktur gleichkommen. Über die Struktur der Ribosomen ist bisher bekannt (28), daß ein normales 80-S-Ribosom aus zwei Untereinheiten, einer größeren und einer kleineren, die mit 60 S bzw. 40 S sedimentieren, aufgebaut wird. Aus den schweren Untereinheiten läßt sich die mit 28 S, aus den leichten die mit 18 S sedimentierende RNS extrahieren. Mit der Änderung der Ribosomenstruktur und der oben beschriebenen Fehlleistung in der Synthese polysomaler m-RNS läßt sich als Folge davon eine Störung der Ribosomenfunktion erklären, die in dem festgestellten Defizit an Polysomen zum Ausdruck kommt. Verfolgt man die Synthese der für die Ribosomen - Untereinheiten charakteristischen RNS - Qualitäten nach verschiedenen Inkubationszeiten mit ^{14}C - Orotsäure, so zeigen die NNM - Tiere eine gegenüber den Kontrollen beschleunigte Synthese der 18-S-RNS. Dieser Befund kann als weiterer Hinweis auf die bereits aus den Basenanalysen geschlossene Veränderung der 18-S-RNS gesehen werden, so daß die aus ihr gebildeten kleinen Untereinheiten nur noch in begrenztem Umfange funktionsfähig sind. Möglicherweise verlieren sie die Fähigkeit, sich mit der großen Untereinheit zum Ribosom zu vereinigen. Auch ist es denkbar, daß kleine Untereinheiten miteinander aggregieren, wie es bei bestimmten Veränderungen des Ionenmilieus beobachtet worden ist (29,30). In jedem Fall würde letztlich eine Störung der Proteinbiosynthese resultieren. In diesem Zusammenhang sei auch auf die schon früher nachgewiesene reduzierte cytoplasmatische Eiweißsynthese carcinomatöser Lebern (26,31, 32) hingewiesen.

V.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Untersuchung des Verhaltens verschiedener RNS - Qualitäten während des durch NNM - Applikation bei männlichen Ratten induzierten praecancerösen Stadiums eines Hepatoms werden folgende Befunde erhoben:

1. Im Basenverhältnis aller RNS - Fraktionen treten Verschiebungen auf, die insbesondere durch Veränderungen des Guanin - Anteils bedingt sind.
2. Die Konzentration der RNS ribosomalen Typs ist in den durch NNM geschädigten Kernen beträchtlich erhöht.
3. Es wird ein Defizit an polysomaler m-RNS beobachtet, als dessen Ursache eine durch die veränderte RNS - Primärstruktur bedingte Alteration der Ribosomen angesehen wird. Die Erhöhung der Synthese ribosomaler RNS wird damit als Kompensationsversuch für das Fehlen regelhaft gestalteter und funktionierender Ribosomen diskutiert.

Herrn Privatdozent Dr. Dr. H. F a s o l d danke
ich für die Übernahme des Referates, sowie

Herrn Professor Dr. F. B r a m s t e d t für die
Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. Dr. J. M e y e r - B e r t e n r a t h
gilt mein aufrichtiger Dank für seine stete Hilfs-
bereitschaft bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. P. B a n n a s c h vom Pathologischen
Institut der Universität Würzburg schulde ich Dank
für die Ausführung und Auswertung der cytologischen
Untersuchungen.

VI.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) MAGEE, P.N. und
SCHOENTAL, R.: Brit.med.Bull., 20,104(1964)
- (2) DRUCKREY, H.,
PREUSSMANN, R.,
SCHMÄHL, D. und
MÜLLER, M.: Naturwiss., 48,134-135(1961)
- (3) BANNASCH, P. und
MÜLLER, H.A.: Arzneimittel-Forsch., 14,805-814
(1964)
- (4) KNORR, L.: Annalen der Chemie, 301,1(1898)
- (5) DIGIROLAMO, A.,
HENSHAW, C. und
HIATT, H.H.: J.molecular Biol., 8,479(1964)
- (6) CHAVEAU, J.,
MOULE, Y. und
ROULLIER, C.: Exp.Cell Res., 11,317(1956)
- (7) WESTPHAL, O.,
LÜDERITZ, O. und
BISTER, F.: Z.Naturforsch., 7b,148(1952)
- (8) GIERER, A. und
SCHRAMM, G.: Z.Naturforsch., 11b,138(1956)
- (9) KIRBY, K.S.: Biochem.J., 64,405(1956)
- (10) GEORGIEV, G.P. und
MANTIEVA, V.L.: BBA, 61,153(1962)
- (11) LITTLEFIELD, I.W. und
KELLER, E.B.: J.biol.Chem., 224,13(1957)
- (12) MEYER, J.G.: Z.Naturforsch., 21b,342-345(1964)
- (13) SHEPHARD, G.R. und
PETERSEN, D.F.: J.Chromatogr., 9,445(1962)
- (14) SCHERRER, K. und
DARNELL, I.E.: BBRC, 7,486(1962)
- (15) GROSS, F., HIATT, H.,
GILBERT, W.,
KURLAND, G.,
RISEBROUGH, R.W. und
WATSON, J.D.: Nature(Lond.), 190,581(1961)
- (16) ZIMMERMANN, E. und
SCHMIDT, D.D.: J.Chromatogr., in Druck

- (17) MAGASANIK, B.: in: CHARGAFF, E. u. DAVIDSON, J.N.,
"The Nucleic Acids", Vol.I, p.394/
395, Academic Press Inc., New York
(1955)
- (18) CHARGAFF, E.: in: CHARGAFF, E. u. DAVIDSON, J.N.,
"The Nucleic Acids", Vol.I, p.350/
351, Academic Press Inc., New York
(1955)
- (19) ZACHAU, H.G.: in: "Funktionelle und Morphologi-
sche Organisation der Zelle",
wissensch. Konferenz d.Gesellsch.
deutscher Naturforscher u. Ärzte
in Rottach-Egern 1962, S.49(1963)
- (20) COHN, W.E.: in: CHARGAFF, E. u. DAVIDSON, J.N.,
"The Nucleic Acids", Vol.I, p.231,
Academic Press Inc., New York(1955)
- (21) ALTMANN, H.W. und
OSTERLAND, U.: Beitr.path.Anat., 124,1(1961)
- (22) STEELE, W.J.,
OKAMURA, N. und
BUSCH, H.: J.biol.Chem., 240,1742(1965)
- (23) GEORGII, A. und
MEHNERT, H.: Beitr.path.Anat., 124,287(1961)
- (24) STOECKER, E.: Beitr.path.Anat., 129,247(1964)
- (25) STOECKER, E. und
ALTMANN, H.W.: Z.Krebsforsch., 65,351(1963)
- (26) STOECKER, E. und
KLARNER, P.: Naturwiss., 52,498(1965)
- (27) THOENES, W. und
BANNASCH, P.: Virchows Arch.path.Anat., 335,
556(1962)
- (28) WATSON, J.D.: in: "Molecular Biology of the
Gene", p.325-333, W.A.Benjamin
Inc., New York(1965)
- (29) TASHIRO, Y.,
YPHANTIS, D.,
SABATINI, D. und
SIEKEVITZ, P.: Federation Proc., 23,219(1964)
- (30) TASHIRO, Y. und
SIEKEVITZ, P.: J.mol.Biol., 11,149-165(1965)
- (31) STOECKER, E.: Habilitationsschrift, Universi-
tät Würzburg(1963)
- (32) MURAMATSU, M. und
BUSCH, H.: Cancer Res., 22,1100(1962)

LEBENS LAUF

Am 23. Dezember 1940 wurde ich in Jena als Sohn des Chirurgen Dozent Dr.med.habil. Hans - Albert Dege und seiner Frau Traute, geborene Loewe, geboren.

Die Volksschule besuchte ich von 1947 bis 1948 in Jena, danach in Clausthal - Zellerfeld und von 1950 bis 1951 in Künzelsau. Die Gymnasialzeit verbrachte ich in Delmenhorst als Schüler des Gymnasiums an der Willmsstraße, wo ich im Februar 1960 die Reifeprüfung ablegte.

Nach Absolvierung des einjährigen Wehrdienstes bei der Bundeswehr begann ich im Sommer - Semester 1961 an der Universität München mit dem Medizinstudium. Nach dem Physikum, das ich im Februar 1964 bestand, blieb ich noch für ein Semester in München, studierte im folgenden Winter - Semester in Genf und wechselte anschließend über an die Universität Würzburg, an der ich nach dem Sommer - Semester 1967 mein Staatsexamen ablegte.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Alrick Dege

BÖHLER-DRUCK

87 WÜRZBURG, Wirsbergstr. 10
Tel. 54143